Aus dem Tropenmedizinischen Institut der Universität Tübingen
Kommisarischer Direktor: Professor Dr. med. W. Höfler

ÜBERLEBEN UND ENTWICKLUNGSFÄHIGKEIT VON SCHISTOSOMA MANSONI IN DER WEISSEN MAUS BEI PRIMÄR EINGESCHLECHTLICHER INFEKTION

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von
JOHANNES WESSOLLY
aus Weinsberg

1981

Aus dem Tropenmedizinischen Institut der Universität Tübingen
Kommisarischer Direktor: Professor Dr. med. W. Höfler

ÜBERLEBEN UND ENTWICKLUNGSFÄHIGKEIT VON SCHISTOSOMA MANSONI IN DER WEISSEN MAUS BEI PRIMÄR EINGESCHLECHTLICHER INFEKTION

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard–Karls–Universität
Tübingen

vorgelegt von

JOHANNES WESSOLLY
aus Weinsberg

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. med. H. Haselmann
1.Berichterstatter:	Privatdozent Dr. rer.nat. K. Meier-Brook
2.Berichterstatter:	Professor Dr. med. H.– J. Knüttgen

---

gedruckt bei H.- J. Köhler, Reprografischer Betrieb , Tübingen

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

II. Material und Methoden
A. Material 2
B. Methoden 3
1. Infektion der Schnecken 3
2. Prüfung der Schnecken auf Zerkarienausscheidung 4
3. Infektion der Mäuse 4
4. Geschlechtsbestimmung der Würmer 5
5. Perfusion der Mäuse 6
6. Fixierung und Messung der Würmer 6

III. Ergebnisse
A. Hauptversuch 7
B. Kontrollversuche 9
1a. Kontrollinfektion mit unbekanntem Geschlechtsverhältnis 9
1b. Kontrollinfektion mit bekanntem Geschlechtsverhältnis 10
2. Kontrolle der eingeschlechtlich infiziert gebliebenen Mäuse des Hauptversuchs 10
3. Bestimmung der Leber- und Milzgröße gesunder Mäuse 12

IV. Diskussion 12

V. Zusammenfassung 16

VI. Literaturverzeichnis 18

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0023

I. Einleitung

Cort (1921) stellte die Hypothese auf, daß das Geschlecht von Schistosomen bereits im Ei bestimmt ist und infolgedessen die gesamte im Zwischenwirt produzierte Nachkommenschaft von einem Mirazidium entweder weiblich oder männlich ist. Daß diese Hypothese richtig war, wurde von Severinghaus (1928), Giovannola (1936), Vogel (1941), Maldonado und Herrera (1949) experimentell belegt, und zwar sowohl durch die Untersuchung von Laborinfektionen als auch durch die Untersuchung natürlich infizierter Schnecken. Maldonado und Herrera (1949) stellten dabei fest, daß von natürlich infizierten Biomphalaria glabrata ein erheblicher Teil eingeschlechtlich infiziert war. Weiterhin fanden Vogel (1941) und Maldonado und Herrera (1949), daß sich Männchen und Weibchen von Schistosoma mansoni bei eingeschlechtlicher Infektion unterschiedlich entwickeln. Während sich die Männchen von Schistosoma mansoni (im Gegensatz zu anderen Schistosomenmännchen) zu voller Größe und Geschlechtsreife entwickeln, können das die Weibchen nicht. Außer der Andeutung von Vogel (1962): "If after months or years, male schistosomes invade the same host and embrace the stunted females, growth and maturation suddenly set in ", ist in der Literatur über die Überlebenszeit und den Erhalt der Entwicklungsfähigkeit nichts bekannt. Da offensichtlich in der Natur häufig eingeschlechtliche Infektionen der Zwischenwirte vorkommen, ist es auch wahrscheinlich, daß der Endwirt sich eingeschlechtlich infizieren kann. Bei der zunehmenden Reisetätigkeit zwischen endemischen und nichtendemischen Gebieten ist es denkbar, daß es bei mehreren Aufenthalten einer Person in diesen Gebieten zu mehreren eingeschlechtlichen Infektionen kommen könnte und im Falle aufeinanderfolgender Infektionen mit Zerkarien verschiedenen Geschlechts zur Manifestation der Krankheit. Dies wäre eine Indikation, grundsätzlich Besucher von Bilharziose-Endemiegebieten auf Infektionen zu prüfen, selbst wenn diese als eingeschlechtliche per se keine Krankheit darstellen.

Um zu prüfen, ob die Erkrankungsgefahr auch bei geraumer Zeitspanne zwischen eingeschlechtlicher Infektion und der Reinfektion mit dem anderen Geschlecht noch bestehen könnte, machte ich folgenden Versuch: Ich beobachtete, ob Männchen und Weibchen von Schistosoma mansoni

aus eingeschlechtlichen Infektionen nach der Reinfektion mit dem anderen Geschlecht nach $1\frac{1}{2}$, 3, $4\frac{1}{2}$ und 6 Monaten die gleiche Paarungsbereitschaft, Größenwachstum und Produktion schlüpffähiger Eier zeigen wie nach zweigeschlechtlicher Simultaninfektion.

II. Material und Methoden

A. Material

Als Versuchstiere benutzte ich weiße Mäuse vom Stamm NMRI/Origin. Kisslegg, der ursprünglich aus dem Naval Medical Research Institute Bethesda, Md., U.S.A., stammt. Dort wurden die Mäuse, ausgehend von einem Pärchen des A-Stammes des National Health Institute, Bethesda, seit 1951 gezüchtet. Die hier verwendeten Tiere sind eine reinrassige Koloniezucht der Versuchstierzucht Ivanovas in Kisslegg. Sie zeichnen sich durch geringe Anfälligkeit für Krankheiten und durch große Fertilität aus. Die weiße Maus zeigt sich für Schistosoma mansoni Infektionen sehr empfänglich. Obwohl die Erkrankung bei der Maus sehr akut verläuft, eignet sie sich von den kleinen Versuchstieren am besten für diese Experimente (Standen, 1967). Für die eigentlichen Versuche verwendete ich 4 Wochen alte weibliche Mäuse, da männliche Mäuse eine höhere Mortalität aufweisen (Winter, 1972), im Verlauf der Infektion aggressiv werden und sich gegenseitig angreifen. Männliche Mäuse verwendete ich nur zur Geschlechtsidentifikation der Würmer. Gefüttert wurden die Mäuse mit Altromin^{R}-Standardfutter der Firma Altrogge, Lage (Lippe) und Leitungswasser, und zwar im Überschuß. Die Mäuse wurden in Makrolonkäfigen mit ca. 400 cm^2 Bodenfläche gehalten, 5 - 10 Mäuse je Käfig. Der Raum, in dem die Mäuse untergebracht waren, war gut belüftet, hatte eine Temperatur von 22 - 24^{o}C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50 - 65%. Die dem Tageslicht entsprechende Beleuchtung war täglich 11 Stunden eingeschaltet, unabhängig von der Jahreszeit.

Der verwendete Schistosoma mansoni-Stamm "BHSM 67" wurde 1967 von Dr. W. L. Paraense in Belo Horizonte in Brasilien in Biomphalaria glabrata-Schnecken isoliert. Seit 1967 wird dieser Stamm im Tropenmedizinischen Institut, Tübingen, gehalten. Als Zwischenwirt verwendete ich Biomphalaria glabrata-Schnecken aus Belo Horizonte, die seit 1967 ebenfalls im Tropenmedizinischen Institut, Tübingen, gehalten werden. Die Schnecken wurden bei konstanter Raumtemperatur von 26°C in Makrolonaquarien gehalten. Das entchlorte Wasser wurde durchschnittlich jede Woche gewechselt. Die Schnecken wurden mit grünem Salat und "Standen-Futter" gefüttert. Dieses wurde im Labor hergestellt aus 7 g Na-Alginat, 7 g Trockenmilch, 7 g Salatpulver, 7 g Weizenkeime und 700 ml Wasser (Standen, 1949).

B. Methoden

1. Infektion der Schnecken

Mäuse, die an einer mindestens 2 Monate alten Infektion litten, lieferten das Mirazidienmaterial. Den zerkleinerten Kot wusch ich mehrmals in physiologischer Kochsalzlösung aus und brachte die Mirazidien dann in entchlortem, 30°C warmem Wasser (Stirewalt, 1954) in einem speziellen Schlüpfkolben zum Schlüpfen. Nach ca. 15 Minuten waren die ersten Mirazidien zu sehen. Ich entnahm von der Oberfläche mit einer Pipette eine geringe Menge mirazidienhaltigen Wassers, das ich in ein Blockschälchen brachte. Auf diese Weise erhielt ich 1 - 5 Mirazidien je Portion. Mit einer frischen Pipette entnahm ich ein einzelnes Mirazidium und brachte es mit einigen Tropfen Wasser in ein anderes Blockschälchen. Dann kontrollierte ich, ob ich auch tatsächlich nur ein Mirazidium angesaugt hatte. Mit einer frischen Pipette brachte ich das Mirazidium in ein Gläschen, das mit einem Milliliter entchlortem Wasser von 26°C gefüllt war und kontrollierte nochmals. Auf diese Weise konnte ich sicher sein, daß nur jeweils ein Mirazidium mit einer Schnecke zusammenkam. Dieser Arbeitsgang fand bei 10-facher Vergrößerung unter dem Binokular statt. Anschließend warf ich in jedes Gläschen eine Biomphalaria glabrata. Die Gehäusedurchmesser betrugen zwischen 0,5 und 1,2 cm. Die Gläschen stellte ich in einen Raum mit

der konstanten Temperatur von 26° C. Bei dieser Temperatur ist der größte Infektionserfolg zu erwarten (Stirewalt, 1954). Da die Infektionstüchtigkeit der Mirazidien vom Schlüpfen an abnimmt, verwendete ich ausschließlich Mirazidien, die nicht früher als 2 Stunden vorher geschlüpft waren.
Schnecken, die versuchten, aus dem Wasser zu kriechen, brachte ich durch leichtes Aufklopfen des Gläschens auf die Tischplatte in dasselbe zurück. Als Infektionszeit wählte ich 2 Stunden, da Vogel (1941) beschrieben hat, daß nach dieser Zeit 85 - 90% der Mirazidien eingedrungen sind. Nach zwei Stunden nahm ich die Schnecken heraus, spülte sie einzeln ab und setzte sie in ein Aquarium.

2. Prüfung der Schnecken auf Zerkarienausscheidung

Frühestens 28 Tage nach der Infektion setzte ich die Schnecken einzeln in Küvetten, die mit 26° C warmem entchlortem Wasser gefüllt waren und beleuchtete dieselben. Nach ca. einer halben Stunde schieden die ersten Schnecken Zerkarien aus. Die negativen trennte ich von den positiven Schnecken und wiederholte das Durchprüfen über einen Zeitraum von 3 Wochen mehrmals. Schnecken, die dann immer noch keine Zerkarien abgaben, vernichtete ich. Um für den gesamten Zeitraum des Hauptversuchs genügend eingeschlechtlich infizierte Schnecken zu haben, führte ich im Abstand von 2 Monaten 4 Infektionen durch, wobei ich insgesamt 303 Schnecken exponierte. Der Infektionserfolg war unterschiedlich. Der erste Infektionsversuch ergab 29%, der zweite 11%, der dritte 29%, der vierte 23% Schnecken mit Zerkarienproduktion.

3. Infektion der Mäuse

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Mäuse zu infizieren. Ich wählte die pedale Infektion, weil sie am einfachsten durchzuführen ist: In Glasbehälter, die mit einem Deckel aus Drahtgeflecht verschlossen werden können, goß ich so viel 26° C warmes entchlortes Wasser, daß der Boden $1\frac{1}{2}$ cm hoch bedeckt war.
Vorher hatte ich die Behälter sorgfältig ausgespült, um eventuell vorhandene Spülmittelrückstände zu entfernen. Dann brachte ich die Zerkarien in das Wasser, setzte die Mäuse hinein und verschloß die Be-

hälter. Diese Methode hat folgende Nachteile: Durch die Verunreinigung des Wassers mit Urin und Kot werden die Zerkarien in ihrer Lebensfähigkeit beeinträchtigt (Olivier und Stirewalt, 1952), so daß weniger Zerkarien eindringen als in sauberem Wasser. Übriggebliebene Zerkarien können wegen der Verschmutzung des Wassers nicht gezählt werden; außerdem können die Mäuse gerade penetrierende Zerkarien weglecken und -spritzen. Will man genau wissen, wieviele Zerkarien eingedrungen sind, bedient man sich besser der Schwanzinfektion (Olivier und Stirewalt, 1952). Dabei werden die Mäuse festgebunden und der Schwanz in das zerkarienhaltige Wasser getaucht. Anschließend werden die nicht eingedrungenen Zerkarien gezählt. Da es mir nicht darauf ankam, die genaue Anzahl der eingedrungenen Zerkarien zu kennen, infizierte ich die Mäuse pedal. Ich ließ die Mäuse 2 Stunden im Wasser, weil diese Zeit für die Penetration der Zerkarien ausreicht (Stirewalt, 1951).

4. Geschlechtsbestimmung der Würmer

Die Schnecken, die ich erfolgreich infiziert hatte, wurden unter Beleuchtung zur Zerkarienabgabe gebracht. Vorher spülte ich sie einzeln ab, damit etwa anhaftende Zerkarien aus anderen Schnecken sicher entfernt wurden. Nach 2 Stunden infizierte ich jeweils eine Maus mit dem gesamten Zerkarienausstoß einer Schnecke. Die Zerkarienanzahl betrug zwischen 10 und ca. 2 000. Die Mäuse hatte ich vorher unverwechselbar mit Pikrinsäurelösung markiert. Die Schnecken setzte ich in ein Aquarium, das durch perforierte Quer- und Längswände in einzelne Kammern aufgeteilt war, und bedeckte es mit einer dichtschließenden Glasplatte, um zu verhindern, daß die Schnecken in andere Kammern krochen. Die Kammern numerierte ich, um Schnecke und zugehörige Maus einander genau zuordnen zu können. Jeweils 28 Tage nach der Infektion perfundierte ich die Mäuse. Zu diesem Zeitpunkt ist das Geschlecht der Würmer eindeutig bestimmbar (Vogel, 1941).
Rhagunatan und Bruckner (1975) beschrieben eine elegantere Methode zur Geschlechtsbestimmung. Sie konnten in Zellkernen von Zerkarien nach Färbung mit Thionin und Carbolfuchsin "sex-chromatin-bodies" nachweisen, eines bei weiblichen und zwei bei männlichen Zerkarien. Sie gaben an, daß man bei sorgfältiger Arbeit mit bis zu hundertprozentiger

Sicherheit das Geschlecht bestimmen könnte, räumten aber gleichzeitig ein, daß dazu sehr viel Erfahrung gehört. Deshalb habe ich das zwar umständlichere, aber sicherere Verfahren der pedalen Infektion gewählt.

Insgesamt infizierte ich 67 Mäuse zur Geschlechtsbestimmung der Schistosomen. Von 58 überlebenden Mäusen waren 25 weiblich (ca. 43%) und 33 männlich (ca. 57%) infiziert.

5. Perfusion der Mäuse

Zur Perfusion der Mäuse habe ich das Verfahren nach Duvall und de Witt (1967) in vereinfachter Form angewandt. Den Mäusen injizierte ich 17 mg Nembutal^{R} in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitonaeal, wodurch zugleich der Tod der Mäuse und eine Betäubung der Würmer bewirkt wurde. Die Würmer können sich dann nicht mehr an der Venenwand halten und werden leicht abgeschwemmt. Die Mäuse werden dann geöffnet und 10 ml der Perfusionslösung (3,75 g Na-Citrat in 500 ml physiol. Kochsalzlösung) in den linken Ventrikel injiziert. Danach eröffnete ich die Pfortader der Länge nach um zu vermeiden, bereits in der Pfortader angeschwemmte Würmer zu zerschneiden. Die Mäuse hielt ich so, daß ihre Eingeweide in ein Spitzglas tauchten, das mit physiol. Kochsalzlösung gefüllt war. Anschließend injizierte ich weitere 30 ml der Perfusionslösung in den linken Ventrikel. Diese Menge reicht in der Regel aus, um die Schistosomen sowohl aus der Leber als auch aus den Mesenterialvenen zu spülen (Duvall und de Witt, 1967). Da häufig Würmer am Peritonaeum, vor allem in Pfortadernähe haften bleiben, spülte ich die Eingeweide in demselben Spitzglas sorgfältig und durchsuchte sie anschließend (Duvall und de Witt, 1967). Einzelne Würmer können sich in der Leber oder in den Mesenterialgefäßen halten. Diese zog ich mit einer spitzen Federstahlpinzette heraus und gab sie ebenfalls in das Spitzglas. Nachdem sich die Würmer am Boden des Glases abgesetzt hatten, saugte ich sie mit einer Pipette ab.

6. Fixierung und Messung

Um die Länge der Schistosomen zu einem späteren Zeitpunkt bestimmen zu können, verbrachte ich sie sofort nach der Perfusion in Beckers Fixier-

lösung (Reichenow et al., 1969), und zwar die Ausbeute aus jeder Maus in ein eigenes Gefäß. Beim Fixieren schrumpfen die Würmer zwar (Vogel, 1941); da ich aber alle Würmer gleich behandelt habe, gehe ich davon aus, daß alle im gleichen Verhältnis geschrumpft sind.
Zur Messung zeichnete ich die Schistosomen bei 20-facher Vergrößerung unter einem Wild-Stereomikroskop M7 mit Zeichenspiegel auf und bestimmte durch Anlegen eines Fadens die Länge.

III. Ergebnisse

A. Hauptversuch

Ich exponierte 5 Gruppen zu je 5 Mäusen je 100 männlichen Zerkarien und 5 gleichgroße Gruppen je 100 weiblichen Zerkarien. Jede Gruppe erhielt Zerkarien aus einer Schnecke und wurde in einem eigenen Käfig gehalten. Nach $1\frac{1}{2}$, 3, $4\frac{1}{2}$ und 6 Monaten reexponierte ich je eine Maus aus jeder Gruppe 120 Zerkarien des jeweils anderen Geschlechts. Ich verwendete 120 Zerkarien, um einen Überschuß und damit die Möglichkeit zur Paarung für alle Würmer der ersten Infektion zu erreichen. Das erwies sich als unbrauchbar, da die Zahl der penetrierenden Zerkarien zu sehr schwankt. Vorher führte ich einen Mirazidienschlüpftest durch, um eine versehentliche zweigeschlechtliche Infektion auszuschließen. 8 Wochen nach der Reinfektion nahm ich erneut einen Schlüpftest vor, öffnete und perfundierte die Mäuse. Um die Anzahl der vorhandenen gepaarten Würmer und die pathologischen Veränderungen an Leber und Milz zueinander in Beziehung setzen zu können, bestimmte ich im Meßzylinder das Volumen von Leber und Milz und beobachtete die Veränderung der Leberoberfläche durch die Granulome, die sich um die Schistosomeneier bilden. Die Vergrößerung des Leber- und Milzvolumens habe ich als einen Indikator für die Schwere der Infektion genommen. Das Ausmaß der granulomatösen Veränderungen bewertete ich mit folgender Stadieneinteilung: O bedeutet, daß die Leberoberfläche normal aussah, ++++ bedeutet, daß sich die Ränder der Granulome berührten. Die Zwischenstufen sind durch

Tabelle I: Wurmzahl, pathologische Veränderungen und Abgabe schlüpffähiger Eier (Mir. +) bei Mäusen nach zunächst ♂ (links) oder ♀ (rechts) Infektion mit Schistosoma mansoni. Granulome an der Leberoberfläche abgestuft von abwesend (O) über vereinzelt (+) bis dichtestmöglich (++++).
♂♀ - Pärchen in copula, ♂♂ - freie Männchen, ♀♀ - freie Weibchen.

Intervall zwischen 1. und 2. Infektion	Nr.	Gew. (g)	Vol. (ml) Leber	Vol. (ml) Milz	♂♀	♂♂	♀♀	Granul. Leber	Mir.	Nr.	Gew. (g)	Vol. (ml) Leber	Vol. (ml) Milz	♂♀	♂♂	♀♀	Granul. Leber	Mir.
	1	34,9	3,5	1,3	6	3	–	+++	+	21	30,9	2,5	0,5	3	76	–	++	+
	2	33,0	3,5	0,9	9	1	10	++++	+	22	34,1	2,5	0,7	10	55	–	++	+
1½	3	34,1	4,0	1,2	11	–	47	+++	+	23	32,2	3,5	1,5	30	44	–	+++	+
	4	gestorben								24	29,0	3,5	0,9	23	13	–	++++	+
	5	gestorben								25	26,1	2,5	0,5	34	1	1	++++	+
	6	42,3	2,0	0,3	2	18	–	O–+	+	26	43,2	3,0	0,4	30	12	2	++	+
	7	41,1	3,5	0,4	3	5	–	+	+	27	keine Geschlechtsbestimmung möglich							
3	8	47,4	2,5	0,25	3	23	–	+	+	28	40,0	3,5	0,6	17	24	–	++	+
	9	45,3	3,5	0,4	8	43	–	+–++	+	29	42,3	3,0	0,4	8	40	–	+	+
	10	38,5	2,0	0,3	2	36	–	+	+	30	gestorben							
	11	35,8	3,5	0,6	30	2	23	++–+++	+	31	41,8	2,0	0,4	9	–	54	O–+	+
	12	42,8	3,0	0,5	7	–	22	+–++	+	32	44,0	3,0	0,3	7	3	30	++	+
4½	13	37,1	3,0	0,5	11	4	–	+++	+	33	34,6	3,0	0,3	10	–	42	++	+
	14	36,1	3,0	0,4	21	8	21	+++	+	34	32,5	3,0	0,4	10	–	22	++	+
	15	31,4	3,0	0,5	14	–	2	+++	+	35	32,5	3,0	0,4	2	–	7	++	+
	16	34,3	4,0	0,6	13	–	3	++–+++	+	36	42,9	4,0	0,4	29	2	1	++	+
	17	40,9	4,0	0,6	11	–	48	++	+	37	34,5	3,0	0,4	26	33	–	++	+
6	18	38,7	3,0	0,4	10	–	17	++–+++	+	38	39,8	3,0	0,3	24	5	–	+–++	+
	19	32,5	3,5	0,1	45	–	5	+++	+	39	33,6	3,0	0,3	25	3	–	+–++	+
	20	gestorben								40	34,3	2,5	0,3	28	3	–	++	+

die entsprechende Anzahl von Kreuzen gekennzeichnet. Eine eindeutige Korrelation zwischen Hepatosplenomegalie und Granulomdichte an der Leberoberfläche konnte ich nicht nachweisen.
Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt.

B. Kontrollversuche

Für den Fall negativer Befunde bei den größeren Infektionsintervallen würden verschiedene Ursachen in Frage gekommen sein: 1. Das relativ hohe Alter der Mäuse (7 Monate beim 6-Monatsintervall) könnte die Empfänglichkeit der Mäuse für die Infektion stark herabgesetzt haben (Ghandour et al., 1973). 2. Es hätte sein können, daß die erste Infektion nicht bis zur zweiten überdauert hätte. 3. Die erste Infektion hätte eine Immunität bewirken können. Die Volumina von Leber und Milz kranker Tiere wollte ich mit den Organgrößen gesunder Tiere vergleichen.

1a. Kontrollinfektion mit unbekanntem Geschlechtsverhältnis

Ich infizierte 7 Monate alte weibliche Mäuse mit je 200 Zerkarien, die aus mehreren, verschiedengeschlechtlichen Infektionen stammten. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Zerkarien war unbekannt.
Ergebnis:

Tabelle IIa: Wurmzahl, pathologische Veränderungen und Abgabe schlüpffähiger Eier (Mir. +) bei Mäusen nach Simultaninfektion mit 200 Zerkarien von Schistosoma mansoni (Geschlechterverhältnis unbekannt). Mäusealter bei Infektion 7 Monate. Granulome an der Leberoberfläche abgestuft von abwesend (0) über vereinzelt (+) bis dichtestmöglich (++++). ♂♀ - Pärchen in copula, ♂♂ - freie Männchen, ♀♀ - freie Weibchen.

Nr.	Gew. (g)	Vol. (ml) Leber	Vol. (ml) Milz	♂♀	♂♂	♀♀	Granul. Leber	Mir.
1	32,3	2,5	0,5	29	-	22	++-+++	+
2	31,2	2,5	0,5	14	11	23	++	+
3	35,6	3,0	0,5	26	3	28	+-++	+
4	34,8	3,0	0,5	14	6	23	+-++	+
5	gestorben							

1b. Kontrollinfektion mit bekanntem Geschlechtsverhältnis

Zusätzlich infizierte ich wiederum 7 Monate alte weibliche Mäuse mit je 100 weiblichen und 100 männlichen Zerkarien um zu sehen, ob sie gleichermaßen in Mäuse dieses Alters eindringen.

Ergebnis:

Tabelle IIb: Wurmzahl, pathologische Veränderungen und Abgabe schlüpffähiger Eier (Mir. +) bei Mäusen nach Simultaninfektion mit 100 weiblichen und 100 männlichen Zerkarien von Schistosoma mansoni. Mäusealter bei Infektion 7 Monate. Granulome an der Leberoberfläche abgestuft von abwesend (O) über vereinzelt (+) bis dichtestmöglich (++++). ♂♀ - Pärchen in copula, ♂♂ - freie Männchen, ♀♀ - freie Weibchen.

Nr.	Gew. (g)	Vol. (ml) Leber	Vol. (ml) Milz	♂♀	♂♂	♀♀	Granul. Leber	Mir.
1	40,2	2,5	0,2	17	15	1	++	+
2	36,3	3,0	0,3	35	10	-	++	+
3	37,3	2,5	0,4	1	-	1	O–+	-
4	33,8	3,0	0,3	44	31	-	++	+
5	30,7	2,5	0,3	10	1	-	+–++	+

2. Kontrolle der eingeschlechtlich infiziert gebliebenen Mäuse des Hauptversuchs

Von den Mäusen, die ich für den Hauptversuch eingeschlechtlich infiziert hatte, blieben 4 weiblich infizierte und 4 männlich infizierte übrig. Ich perfundierte sie 8 Monate nach der Infektion.

Ergebnis:

Tabelle IIIa: Wurmzahl, pathologische Veränderung und Abgabe schlüpffähiger Eier (Mir. +) bei Mäusen nach Infektion mit 100 männlichen Zerkarien von Schistosoma mansoni. Mäusealter bei Infektion 1 Monat. Granulome an der Leberoberfläche abgestuft von abwesend (O) über vereinzelt (+) bis dichtestmöglich (++++). ♂♀ - Pärchen in copula, ♂♂ - freie Männchen, ♀♀ - freie Weibchen.

Nr.	Gew. (g)	Vol. (ml) Leber	Vol. (ml) Milz	♂♀	♂♂	♀♀	Granul. Leber	Mir.
1	39,0	1,5	0,2	-	14	-	O	-
2	34,0	2,5	0,2	-	26	-	O	-
3	37,7	2,5	0,2	-	23	-	O	-
4	38,7	2,5	0,2	-	28	-	O	-

Tabelle IIIb: Wurmzahl, pathologische Veränderung und Abgabe schlüpffähiger Eier (Mir. +) bei Mäusen nach Infektion mit 100 weiblichen Zerkarien von Schistosoma mansoni. Mäusealter bei Infektion 1 Monat. Granulome an der Leberoberfläche abgestuft von abwesend (O) über vereinzelt (+) bis dichtestmöglich (++++). ♂♀ - Pärchen in copula, ♂♂ - freie Männchen, ♀♀ - freie Weibchen.

Nr.	Gew. (g)	Vol. (ml) Leber	Vol. (ml) Milz	♂♀	♂♂	♀♀	Granul. Leber	Mir.
1	35,5	1,5	0,2	-	-	16	O	-
2	42,7	2,5	0,3	-	-	20	O	-
3	42,6	3,0	0,3	1	-	32	O	-
4	45,2	2,5	0,2	-	-	18	O	-

3. Bestimmung der Leber- und Milzgröße gesunder Mäuse

Ich entnahm 8 nicht infizierten weiblichen Mäusen mit verschiedenem Gewicht Leber und Milz und bestimmte im Meßzylinder das Volumen.
Ergebnis:

Tabelle IV: Leber- und Milzvolumina in nichtinfizierten, 7 Monate alten Mäusen.

Nr.	Gew. (g)	Vol. (ml) Leber	Vol. (ml) Milz
1	29,7	2,0	0,15
2	30,0	2,0	0,15
3	33,1	2,0	0,2
4	34,4	2,0	0,2
5	35,3	2,0	0,2
6	39,3	2,5	0,2
7	40,1	2,5	0,2
8	47,5	2,5	0,2

IV. Diskussion

Die eigentliche Fragestellung, ob 6 Monate alte eingeschlechtliche Infektionen erfolgreich mit dem anderen Geschlecht reinfiziert werden können, kann eindeutig mit ja beantwortet werden. Da die Infektionen des 6-Monats-Intervalls kaum schwächer waren als die ersten, halte ich es für möglich, daß eine erfolgreiche Reinfektion auch noch nach längeren Intervallen erreicht werden kann. Es scheint dabei keine Rolle zu spielen, daß sich Weibchen ohne Männchen nur sehr wenig entwickeln, da es keine Unterschiede bezüglich der pathologischen Veränderungen an Leber und Milz, der Di- und Mirazidienproduktion gab zwischen Mäusen, die zuerst weiblich, und solchen, die zuerst männlich infiziert worden waren.

Eine statistische Auswertung der Längenunterschiede zwischen gepaarten und ungepaarten Schistosomenweibchen unterließ ich aus folgendem Grund: die kleinen, ungepaarten Weibchen lagen bis auf wenige Ausnahmen spiralig aufgerollt vor und es gelang mir nicht, sie so zu strecken, daß sie in einer Ebene lagen. Es ergeben sich beim Zeichnen dadurch falsche Werte, weil hier die dreidimensionale Lage nicht berücksichtigt werden kann. Die wenigen kleinen Weibchen, die gestreckt vorlagen und dadurch meßbar waren, reichten nicht für einen statistischen Vergleich aus. Die gepaarten Weibchen wiesen eine Länge zwischen 3,5 mm und 5,7 mm auf, die Soloweibchen zwischen 1,4 mm und 3,3 mm. Vogel (1941) fand Längen zwischen 9,2 mm und 5,4 mm bei gepaarten und 4,07 mm und 2,87 mm bei ungepaarten Weibchen. Die gepaarten Weibchen in der Arbeit von Vogel hatten das gleiche Alter (2 Monate) wie die Weibchen meines Versuchs, die ungepaarten waren 10 Monate alt. Die von mir gemessenen Soloweibchen wiesen ein Alter von 8 Monaten auf.

Von den Mäusen des Hauptversuchs starben 4 vor der Perfusion. Für Maus Nr. 4 und 5 aus Tabelle I ist der Grund sicherlich in der starken Infektion zu suchen, die alle Mäuse des $1\frac{1}{2}$-Monats-Intervalls aufwiesen. Weniger gut erklärlich ist der Tod von Maus Nr. 20 und 30, da diese Tiere im Mirazidienschlüpftest negativ waren. Zusätzlich starben noch 2 Mäuse der eingeschlechtlich gebliebenen des Hauptversuchs, je eine war weiblich und männlich infiziert, was am wenigsten plausibel erscheint. Allerdings waren von 67 Mäusen, die ich zur Geschlechtsbestimmung der Würmer verwendet hatte, 9 Mäuse 6 - 14 Tage nach der eingeschlechtlichen Infektion gestorben. Eine Lungenschädigung durch wandernde Schistosomula könnte als Todesursache in Betracht kommen.

Um einen Überschuß an Zerkarien des jeweiligen zweiten Geschlechts zu erzielen, hatte ich die Mäuse jeweils 120 Zerkarien bei der Reinfektion ausgesetzt. Ein entsprechender Überschuß als Perfusionsergebnis stellte sich jedoch nur beim $1\frac{1}{2}$-Monats-Intervall und beim 6-Monats-Intervall ein, und auch hier nicht in allen Fällen. Abweichungen gab es in Tabelle I bei Maus Nr. 1, geringe Abweichungen bei Maus Nr. 25 und 36, wobei hier möglicherweise die Weibchen bei der Perfusion von den vorhandenen Solomännchen getrennt worden sind. Beim 3-Monats-Intervall

entsprachen die erst weiblich infizierten Mäuse den Erwartungen, nicht aber die erst männlich infizierten. Hier waren nur sehr wenige Weibchen wiederzufinden. Die Zerkarien dieser Infektion stammten aus einer älteren Schneckeninfektion, während ich zu allen anderen Infektionen Zerkarien benützte, die 28 - 30 Tage nach der Mirazidienexposition geschlüpft waren. Zum Zeitpunkt der Infektion des 3-Monats-Intervalls hatte die Schneckeninfektion nur weibliche Zerkarien geliefert.
Beim $4\frac{1}{2}$-Monats-Intervall zeigte sich ein anderes Bild. Bei der erst männlich infizierten Gruppe waren die Weibchen (mit Ausnahme von Maus Nr. 13 aus Tabelle I) in der Überzahl, bei der erst weiblich infizierten Gruppe ebenfalls, und zwar sehr deutlich. Es waren nur sehr wenige Männchen zur Entwicklung gelangt. Bei denjenigen Gruppen, die einen Überschuß an Würmern der Zweitinfektion tatsächlich aufwiesen, darf man sich nicht darüber hinwegtäuschen lassen, daß der Überschuß oftmals höher war als 20%, die Menge, die ich bei der Zweitinfektion zugezählt hatte. Auffallende Beispiele sind aus Tabelle I Maus Nr. 3, 17, 21, 22 und 23.
Die unterschiedlichen Infektionserfolge innerhalb einer Gruppe, wie auch im Vergleich der verschiedenen Gruppen eines Intervalls und der Gruppen aus verschiedenen Intervallen untereinander, sind zum Teil erklärbar, zum Teil bisher nicht. Sicherlich spielt die Methode der pedalen Infektion eine Hauptrolle dabei. Möglicherweise gibt es Unterschiede in der Penetrationsfähigkeit verschiedener Zerkariengenerationen (siehe 3-Monats-Intervall, erst männlich infiziert, Tabelle I) und individuelle Unterschiede in der Empfänglichkeit von Mäusen für Infektionen (siehe Tabelle I, Maus Nr. 7 und 35, Tabelle IIb, Maus Nr. 3). Weitere Störfaktoren können das Alter der Zerkarien und der Mäuse sein. Olivier (1966) stellte fest, daß Zerkarien in den ersten ca. $3\frac{1}{2}$ Stunden nach Erscheinen die stärkste Penetrationsfähigkeit besitzen, die dann stetig abnimmt. Die Zerkarien, die ich zur Infektion verwendete, waren nie älter als 2 Stunden, so daß dieser Faktor keine Rolle spielen sollte. Daß junge Mäuse für eine Infektion empfänglicher sind als alte, beschrieben Ghandour und Webbe (1973), da die Festigkeit der Mäuschaut mit wachsendem Alter zunehme und die Haut damit eine immer stärkere Barriere für die Zerkarien darstelle. Für diese Annahme ergeben meine Versuche keinen Hinweis. (Vergleiche $1\frac{1}{2}$-Monats-Intervall

mit 6-Monats-Intervall in Tabelle I und die guten Infektionserfolge der Kontrollversuche 1a und 1b, Tabelle IIa und IIb). Die Kontrollinfektion 1b mit bekanntem Geschlechtsverhältnis führte ich durch, um eventuelle geschlechtsgebundene Unterschiede im Penetrationsvermögen der Zerkarien nachzuweisen. In 3 Fällen (Maus Nr. 1, 2 und 4 aus Tabelle IIb) haben sich tatsächlich mehr Weibchen als Männchen zu adulten Würmern entwickelt.

Volumenänderungen von Leber und Milz sowie das Auftreten von Granulomen an diesen Organen waren bei allen zweigeschlechtlichen Infektionen in unterschiedlicher Ausprägung vorhanden. Zum Vergleich der Volumina dienten die Organe von 8 gesunden Mäusen (Tabelle IV). Die stärksten Schäden zeigten die Organe der Mäuse des $1\frac{1}{2}$-Monats-Intervalls. Möglicherweise ist das ein Hinweis darauf, daß junge Tiere durch eine Infektion stärker in Mitleidenschaft gezogen werden als ältere. Auffällig war bei diesem Intervall die erst männlich infizierte Gruppe, da hier von relativ wenigen Pärchen sehr starke pathologische Veränderungen hervorgerufen wurden. Auch bei den anderen Tieren ließ sich eine deutliche Beziehung zwischen der Anzahl der Pärchen, Granulomdichte in der Leber und der Vergrößerung der Milz aus meinen Ergebnissen nicht ablesen. (Vergleiche Maus Nr. 1 und 40 in Tabelle I.) Auch bei menschlichen Infektionen mit Schistosoma mansoni konnten Farooq et al. (1966, Tabelle 7) eine enge Beziehung zwischen Eiausscheidung und Schwere der Erkrankung nicht aufzeigen, wohl aber bei Infektionen bei Schistosoma haematobium. Maus Nr. 19 aus Tabelle I hatte eine extrem kleine Milz, die unter dem Durchschnitt der Milzgröße der gesunden Mäuse lag. Dies ist angesichts der gleichzeitig bestehenden starken Infektion unerklärlich. Die eingeschlechtlich infiziert gebliebenen Mäuse zeigten keine auffälligen Veränderungen (Tabelle IIIa und IIIb). Bei Maus Nr. 3 (Tabelle IIIb), die eigentlich weiblich infiziert hätte sein sollen, fand sich ein Pärchen. Die männliche Zerkarie wurde wahrscheinlich durch Unachtsamkeit bei der Infektion in einem Wassertropfen übertragen. Dies war jedoch der einzige offenkundig gewordene Fall eines Infektionsfehlers.

Eingeschlechtliche Infektionen natürlich infizierter Endwirte wurden bisher noch nicht mit direkten Nachweisen belegt. Zwar haben Maldonado

et al. (1949) beobachtet, daß von 67 natürlich infizierten Schnecken 38 bisexuell, 19 männlich und 10 weiblich infiziert waren, doch sagt dies nichts über die Wahrscheinlichkeit aus, mit der sich Endwirte eingeschlechtlich infizieren; denn die eingeschlechtlich infizierten Schnecken kommen selbstverständlich in Gesellschaft anderer vor. Der Verdacht, daß sich Reisende zwischen endemischen und nichtendemischen Gebieten sich relativ häufig eine eingeschlechtliche Schistosomeninfektion zuziehen, liegt nahe, wenn man Untersuchungsergebnisse an Heimkehrern betrachtet. Positiver Einachweis ist recht selten, während immunologische Reaktionen mit Schistosomen-Antigenen wesentlich häufiger positiv sind. Leider ist keine der routinemäßigen Nachweismethoden so spezifisch, daß man aus positiven Befunden bei negativem Direktnachweis mit Sicherheit auf eine eingeschlechtliche Infektion schließen dürfte. Es kommt hinzu, daß schwache zweigeschlechtliche Infektionen erst lange nach der üblichen Präpatenz einen positiven Einachweis ergeben. Darüber hinaus ist bei ektopischem Sitz von Würmern nicht mit einem Einachweis zu rechnen. Kreuzreaktionen sind außerdem nach dem Eindringen tierpathogener Schistosomatiden-Cercarien (z.B. dermatitiserregender Arten, vgl. Zusammenstellung bei Dönges, 1965) nachgewiesen.

V. Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob eingeschlechtliche Infektionen mit Schistosoma mansoni bei der Reinfektion mit dem anderen Geschlecht nach einem längeren Intervall eine Infektion mit Eiablage ergeben würde. Jeweils 10 weibliche weiße Mäuse, von denen 5 weiblich und 5 männlich infiziert waren, wurden nach $1\frac{1}{2}$, 3, $4\frac{1}{2}$ und 6 Monaten mit Zerkarien des anderen Geschlechts infiziert.

In allen Fällen wurde eine Infektion erzielt, die zur Produktion von Eiern mit lebenden Mirazidien führte. Es spielte keine Rolle, ob die Mäuse zuerst mit weiblichen oder mit männlichen Zerkarien infiziert

worden waren. Es ergab sich kein Hinweis darauf, daß ältere Mäuse von weniger Zerkarien penetriert wurden, doch zeigten jüngere Mäuse eine stärkere Vergrößerung der Milz und größere Schäden durch Granulome an der Leber, selbst bei geringerem Wurmbefall, als die älteren Mäuse.

VI. Literaturverzeichnis

CORT, W. W.: Sex in the trematode family Schistosomidae. Science 53, 226 - 228 (1921)

DÖNGES, J.: Schistosomatiden-Cercarien Süddeutschlands. Ein Beitrag zur Kenntnis dermatitiserregender Trematodenlarven. Z. Tropenmed. Parasitol. 16, 305 - 321 (1965)

DUVALL, R. H. and W. B. DE WITT: An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. Amer. J. trop. Med. Hyg. 16, 483 - 486 (1967)

ELWI, A. M.: Pathological aspects of bilharziasis in Egypt, 39 - 44. In: MOSTOFI, F. K.: Bilharziasis, Berlin (Springer) 1967

FAROOQ, M., S. A. SANAAN and J. NIELSEN: Assessment of severity of disease caused by Schistosoma haematobium and Schistosoma mansoni in the Egypt - 49 Project Area. Bull. Wld. Hlth. Org. 35, 389 - 404 (1966)

GHANDOUR, A. M. and G. WEBBE: A study of the death of Schistosoma mansoni cercariae during penetration of mammalian host skin: The influence of the ages of the cercariae and of the host. Int. J. Parasit. 3, 789 - 794 (1973)

GIOVANNOLA, A.: Unisexual infection with Schistosoma mansoni. J. Parasit. 22, 289 - 290 (1936)

MALDONADO, J. F. and F. V. HERRERA: Schistosoma mansoni infection resulting from single, naturally infected snails. Puerto Rico J. pub. Hlth. 22, 230 - 241 (1949)

OLIVIER, L. J.: Infectivity of Schistosoma mansoni cercariae. Amer. J. trop. Med. Hyg. 15, 882 - 885 (1966)

OLIVIER, L. J. and M. A. STIREWALT: An efficient method for exposure of mice to cercariae of Schistosoma mansoni.
J. Parasit. 38, 19 - 23 (1952)

REICHENOW, E., H. VOGEL und F. WEYER: Leitfaden zur Untersuchung der tierischen Parasiten des Menschen und der Haustiere.
Leipzig (Barth) I - XI, 1 - 418 (1969)

RHAGUNATAN, L. and D. BRUCKNER: Identification of sex in Schistosoma mansoni cercariae.
J. Parasit. 61, 66 - 68 (1975)

SEVERINGHAUS, A. E.: Sex studies on Schistosoma japonicum.
Quart. J. microsc. Sci. 71, 653 - 702 (1928)

STANDEN, O. D.: The relationship of sex in Schistosoma mansoni to migration within the hepatic portal system of experimentally infected mice.
Ann. trop. Med. Parasit. 47, 139 - 145 (1953)

" Laboratory evaluation of schistosomicidal substances.
Trans. Roy. Soc. trop. Med. Hyg. 61, 563 - 570 (1967)

STIREWALT, M. A.: The frequency of bisexual infections of Schistosoma mansoni in snails of the species Australorbis glabratus.
J. Parasit. 37, 42 - 47 (1951)

" Effect of snail maintenance temperatures on development of Schistosoma mansoni.
Exptl. Parasit. 3, 504 - 516 (1954)

VOGEL, H.: Infektionsversuche an verschiedenen Bilharzia-Zwischenwirten mit einem einzelnen Mirazidium von Bilharzia mansoni und Bilharzia japonica.
Zentralbl. f. Bakt. (Abt. I), 148, 29 - 35 (1941)

" Contribution to the solution of bilharziasis problems by German research.
Proc. 1st internat. symp. on bilharziasis, Part I, 91 - 112, Kairo (1962)

WINTER, G.: Abbaustadien der Eier von Schistosoma mansoni im Rektum der Weißen Maus nach Niridazol-Behandlung. Diss., Tübingen (1972)

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H.-J Knüttgen und
Herrn Dr. rer nat. K. Meier-Brook für Themenstellung
und stete Diskussionsbereitschaft.
Frau A. Schmelzeisen und Frau K. Schärfe danke ich
für die freundliche technische Hilfe.

Mein Lebenslauf

Am 22.1.1950 wurde ich in Weinsberg, Kreis Heilbronn, als Sohn des Artes Konrad Wessoly und seiner Ehefrau Ruth, geb. Stoll, geboren. Von 1957 bis 1961 besuchte ich die Volksschule in Aalen/Württ., anschließend trat ich in das private Gymnasium "Schloßschule" in Kirchberg/Jagst ein und wechselte 1965 an das Theodor-Heuss-Gymnasium in Aalen, wo ich 1969 mein Abitur ablegte. Von 1970 bis 1972 absolvierte ich ein Praktikum in der Kochertal-Apotheke in Oberkochen, Ostalbkreis, welches ich mit der pharmazeutischen Vorprüfung abschloß. Im Sommersemester 1974 begann ich mein Medizinstudium an der Eberhard - Karls - Universität in Tübingen, an das sich 1979 das Internatsjahr im Olga-Krankenhaus und im Diakonissen-Krankenhaus in Stuttgart anschloß. Dort legte ich am 20.10.1980 mein Staatsexamen ab.